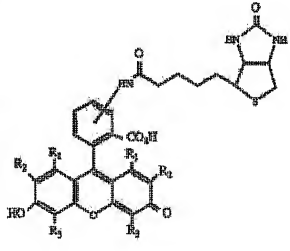
BIOTINYLATED LABELED COMPOUND AND METHOD FOR FLUORESCENT LABELING USING THE SAME

Publication number: JP7157487 (A)
Publication date: 1995-06-20
Inventor(s): SUZUKI OSAMU; ICHIHARA TATSUO; MASUDA GEN; TAKEZAKI KAZUHISA +
Applicant(s): NISSHIN SPINNING +
Classification:
- international: ***C07D495/04; G01N21/78; G01N33/58;*** **C07D495/00; G01N21/77; G01N33/58;** (IPC1-7): C07D495/04; G01N21/78; G01N33/58
- European:
Application number: JP19930339727 19931206
Priority number(s): JP19930339727 19931206

Also published as:
JP3438927 (B2)

Abstract of **JP 7157487 (A)**

PURPOSE:To obtain a new compound useful for fluorescent label DNA probe method for fluorescent label RNA probe method for analyzing a DNA base sequence. CONSTITUTION:A compound of the formula (R1, R2 and R3 are each H, a lower alkyl or a halogen). This compound is obtained by reacting a fluoresceinamine derivative with biotin by a well-known method for forming a peptide bond. The compound of the formula has detection sensitivity more excellent than that of chemical coloring method, is capable of using and storing streptavidin or avidin separately from a biotinylated fluorescent compound, has excellent stability and excellent reproducibility of fluorescent detection. Being simply synthesized, an advantage is inexpensive.; Fluorescent labeling can be carried out by (1) a process for labeling a DNA or an RNA with biotin, (2) a process for reacting the DNA or the RNA labeled by biotin with streptavidin or avidin and (3) a process for reacting the complex obtained by the process (2) with the compound of the formula.



(19)日本国特許庁（JP）　(12)公開特許公報（A）　(11)特許出願公開番号

特開平7－157487

(43)公開日　平成7年(1995)6月20日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C07D 495/04	103			
G01N 21/78		C		
33/58		Z		

審査請求　未請求　請求項の数5　FD　（全 7 頁）

(21)出願番号　特願平5－338727

(22)出願日　平成5年(1993)12月6日

(71)出願人　000004374
日清紡績株式会社
東京都中央区日本橋人形町２丁目31番11号

(72)発明者　鈴木　収
東京都足立区西新井栄町１－18－１　日清紡績株式会社東京研究センター内

(72)発明者　吉原　竜生
東京都足立区西新井栄町１－18－１　日清紡績株式会社東京研究センター内

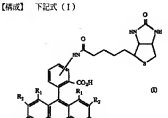
(72)発明者　増田　晃
東京都足立区西新井栄町１－18－１　日清紡績株式会社東京研究センター内

(74)代理人　弁理士　小林　保人　（外1名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ピオチン化誘導化合物及びそれを利用した蛍光標識化方法

(57)【要約】　（修正有）
【目的】　化学発色検出よりも優れた検出感度を有し、ストレプトアビジン又はアビジンと、ピオチン化蛍光化合物を容易々に使用・保存可能であるため、安定性に優れており、使用操作も簡便であり、再現性の高い結果が得られ、合成法も簡便であるため安価に大量調製が可能になるピオチン化標識化合物、及びそれを利用した蛍光標識化方法を提供する。
【構成】　下記式（I）

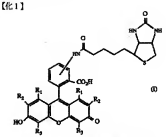


(I)

(式中、R_1乃至R_3は水素、低級アルキル基又はハロゲンを表す）で表されるピオチン化標識化合物であり、又この蛍光標識化方法は、（1）ピオチンによりDNA又はRNAを標識する工程；（2）ピオチンにより標識したDNA又はRNAと、ストレプトアビジン又はアビジンとを反応させる工程；（3）（2）で得た複合体と、上記式（I）ピオチン化標識化合物とを反応させる工程を含む。

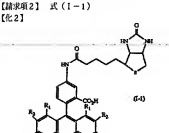
1

【特許請求の範囲】
【請求項1】　式（I）
【化1】



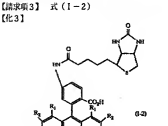
(I)

（式中、R_1乃至R_3は水素、低級アルキル基又はハロゲンを表す）で表されることを特徴とするピオチン化標識化合物。
【請求項2】　式（I－1）
【化2】



(I-1)

で表されることを特徴とする請求項1に記載のピオチン化標識化合物。
【請求項3】　式（I－2）
【化3】

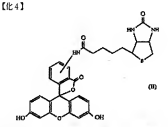


(I-2)

で表されることを特徴とする請求項1に記載のピオチン化標識化合物。
【請求項4】　式（II）

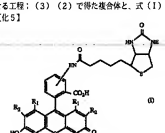
2

【化4】



(II)

で表されることを特徴とする請求項1に記載のピオチン化標識化合物：
【請求項5】　次の工程を含むことを特徴とする蛍光標識化方法：（1）ピオチンによりDNA又はRNAを標識する工程；（2）ピオチンにより標識したDNA又はRNAと、ストレプトアビジン又はアビジンとを反応させる工程：（3）（2）で得た複合体と、式（I）
【化5】



(I)

（式中、R_1乃至R_3は水素、低級アルキル基又はハロゲンを表す）で表されるピオチン化標識化合物とを反応させる工程。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】本発明はＤＮＡ及び配列を解析するための蛍光ラベルＤＮＡプローブ法や蛍光ラベルＲＮＡプローブ法に用いて有用な新規なピオチン化標識化合物、及び、このピオチン化標識化合物を利用した蛍光標識化方法に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】遺伝情報を担う核酸は、Ｇ、Ｃ、Ａ、Ｔ（又はＵ）の塩基を持ち、これら塩基の配列にり個々の遺伝子情報が特定され、ＧとＣ、ＡとＴ（又はＵ）の水素結合により核酸は二本鎖を形成する。従って、この性質を利用すると、核酸の一方の鎖に、化学的又は物理的に検出可能な標識物質を結合した標識プローブは、標識プローブが結合しうる特定の塩基配列を有する核酸との み二本鎖を形成するため、解析対象の塩基配列のみに結合するようにした新記標識プローブによって、目的の核

酸を検出することができる。

【０００３】このような方法の内、ラジオアイソトープ（ＲＩ）を標識物質として使用する方法は、高感度の検出が可能であるもの、使用操作の安全性、経済性、廃棄物処理などに問題があった。

【０００４】このため、ＲＩに代るべき標識物質又は標識方法の探索が従来から進められており、その代表的なものに、ビオチンと、ストレプトアビジン又はアビジンの結合特異性を利用する方法がある。即ち、酵素又は蛍光物質で標識したストレプトアビジン又はアビジン使用して、特定の塩基配列を有する核酸に結合したビオチンとおさえるものである。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記酵素標識の場合は、基質の酵素分解物が色素化行するという化学発色検出であり、検出感度が蛍光検出に比べて劣るため、解析対象の核酸を大量に確保しなければならなかった。

【０００６】一方、蛍光物質の場合、蛍光色素の励起光を照射して発する蛍光により、複合体が間接的に結合した核酸を検出するものであるが、ストレプトアビジン又はアビジンと蛍光色素との化合物が安定性に欠けるため、照射対象での長期保存ができず、核酸の解析において再現性の良い結果を得るのは困難であり、しかも、この化合物を安価に大量に調製することは困難であった。

【０００７】本発明の発明者らは、核酸の検出法について永年に亘り鋭意研究を行なった結果、本願の新規なビオチン化標識化合物を用いることにより、安定性良く、安価かつ簡便に行なうことを見出し、本発明を完成した。

【０００８】即ち、本発明の発明者らは、ビオチンと、ストレプトアビジン又はアビジンの結合特異性を利用した標識及び標識方法について鋭意研究を行ない、ビオチン標識したプローブのビオチン部分に結合したストレプトアビジン又はアビジンに、更にビオチンが結合することができることから、蛍光化合物を結合したビオチンを用いればプローブに蛍光標識をすることができ、これにより、

（１）化学発色検出よりも優れた検出感度を有し、

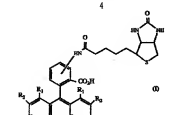
（２）ストレプトアビジン又はアビジンと、ビオチン化蛍光化合物を別々に使用・保存可能であるため、安定性に優れており、使用操作も簡便であり、再現性の高い結果が得られる。

（３）合成法も簡便であるため安価に大量調製が可能になることを見出し、本発明を完成させたものである。

【０００９】

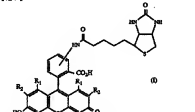
【課題を解決するための手段】本発明の新規なビオチン化標識化合物は、式

【化６】



（式中、R_1乃至R_3は水素、低級アルキル基又はハロゲンを表す）であわされることを特徴とするものであり、又、このビオチン化標識化合物による蛍光標識化方法は、（１）ビオチンによりＤＮＡ又はＲＮＡを化温する工程；（２）ビオチンにより標識したＤＮＡ又はＲＮＡと、ストレプトアビジン又はアビジンとを反応させる工程；（３）（２）で得た複合体と、式

【化７】



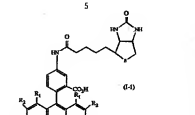
（式中、R_1乃至R_3は水素、低級アルキル基又はハロゲンを表す）であわされるビオチン化標識化合物とを反応させる工程を含むことを特徴とするものである。

【００１０】次に本発明を詳細に説明する。

【００１１】本発明のビオチン化標識化合物は、上記式（１）に明らかなように、フルオレセインアミン誘導体とビオチンとが結合したものであり、フルオレセインアミン誘導体におけるアミノ基の位置により、例えば式

（１－１）

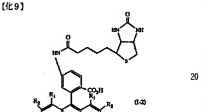
【化８】



（式－１）

であわされるもの や、式（Ｉ－２）

【化９】

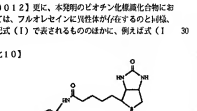


（Ｉ－２）

であわされるものが包含される。

【００１２】更に、本発明のビオチン化標識化合物においては、フルオレセインに異性体が存在するため同様、上記式（１１）であわされるもののほかに、例えば式（１１）

【化１０】



（６Ｉ）

であわされるものも存在する。

【００１３】上記各式における置換基R_1乃至R_3は、水素原子、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシルのような炭素数１乃至６の直鎖又は分枝鎖アルキル基、又は、ハロゲン原子、即ち弗素原子、塩素原子、臭素原子又は沃素原子を表している。

【００１４】尚、本発明のビオチン化標識化合物は、分子内に不斉炭素を有し、各々がＲ配位、Ｓ配位である立体異性体が存在するが、その各々、或いはそれらの混合物のいずれも本発明に包含される。

【００１５】一方、本発明のビオチン化標識化合物は、次のような方法によって製造することができる。即ち、フルオレセインアミン誘導体とビオチンとを、ペプチド結合を生成する公知の方法によって反応させるのである。

【００１６】ペプチド結合を生成する反応としては、エステルーアミド交換反応、ビオチンのカルボン酸部分を活性化された酸残基（例えば、酸ハライド、酸無水物等）に変換し、フルオレセインアミン誘導体と反応させる方法や縮合剤を使用する方法を適宜に採用することができる。

【００１７】縮合剤を使用する方法では、化合物を非プロトン性極性溶媒に溶解し、縮合剤を使用し、有機塩基の存在又は非存在下に反応させればよい。

【００１８】上記縮合剤を使用する反応の際に使用される非プロトン性極性溶媒としては、反応を阻害せず、出発物質をある程度溶解するものであれば特に限定はないが、好適には、蟻酸エステル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、炭酸ジエチルのようなエステル類；アセトニトリル、イソプロピロニトリルのようなニトリル類；ホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルー２－ピロリドン、Ｎ－メチルピロリジノン、ヘキサメチルホスホトリアミドのようなアミド類；ジメチルスルホキシド、スルホランのようなスルホキシド類を例示することができ、更に好ましくは、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドである。

【００１９】又、使用される縮合剤としては、ペプチド結合を生成する方法に通常使用されているものであればよいが、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）のようなカルボジイミド類や２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）を挙げることができ、好適には、ＨＢＴＵである。

【００２０】使用される有機塩基としては、通常の反応において塩基として使用されるものであれば、特に限定はないが、好適には、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、トリブチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ジシクロヘキシルアミンのような有機塩基類を挙げることができ、更に好適には、トリエチルアミンのような第３級アミンである。

【００２１】反応温度及び時間は、主に反応溶媒、原料化合物、反応試薬又は使用される溶媒の種類によって異なるが、通常は、室温において数日間程度である。

【００２２】反応終了後、本発明のビオチン化標識化合物は、沿法に従って、反応混合物から単離される。

【００２３】

【発明の効果】本発明のピオチン化標識化合物は、簡便に合成できるので安価であり、又、経時的に安定な化合物であるので室光検出の再現性は良好で、保存性に優れている。

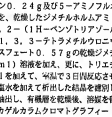
【００２４】

【実施例】以下に、実施例をあげて本発明を更に具体的に説明する。

【００２５】実施例１

ピオチン０．２４g及び５－アミノフルオレセイン０．３５g、化種したジメチルホルムアミド１６mlに溶解した。２－（Ｎ－ベンソリドリノール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメタルウロニウムヘキサフルオロホスフェート０．５７gの乾燥ジメチルホルムアミド（８ml）溶液を加え、更に、トリエチルアミン０．１４mlを加えて、室温で３日間反応させた。反応液に脂肪食塩水を加えて析出した結晶を濾別し塩液を酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展出溶媒：塩化メチレン／メタノール＝５／１、次に、クロロホルム／メタノール＝２／１）で精製し、以下の式（１）で表わされる目的化合物（以下、化合物（１）のようにも表わす）０．２３gを得た（収率４０％）。

【化１１】



(1)

融点：２３８℃（分解）

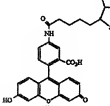
^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（ＤＭＳＯ－ｄ６、ｐｐｍ、δ）：１．３５～１．７５（６Ｈ，ｍ）、２．３９（２Ｈ，ｔ）、２．５９（１Ｈ，ｄ）、２．８４（１Ｈ，ｄ）、３．１６（１Ｈ，ｍ）、４．１６（１Ｈ，ｍ）、４．３１（３Ｈ，ｍ）、６．３７（１Ｈ，ｓ）、６．４８（１Ｈ，ｓ）、６．５０～６．６４（６Ｈ，ｍ）、７．１８（１Ｈ，ｄ）、７．８１（１Ｈ，ｄ）、８．３４（１Ｈ，ｓ）、１０．１５（１Ｈ，ｂｓ）、１０．３５（１Ｈ，ｓ）赤外吸収スペクトル（ＫＢｒ，ｃｍ$^{-1}$）：３３００、１６８５、１６３６、１６０５、１５９１、１４５９、１２９４、１２７２

【００２６】【核酸の検出】マウス腎下腺ＮＧＦ（神経成長因子）のｃＤＮＡ（０．３５kb）をテンプレートとして、ランダムプライマー法でビオチン化ｓｔｒＤＮＡプローブを合成した。このプローブを用い、マウス腎下腺組織切片に対して、ハイブリダイゼーション（insitu）を行なった。ハイブリダイズした後、ストレプトアビジンをブロッキングし、ストレプトアビジン１μgを添加し、０．１Ｍトリス塩酸（ｐＨ７．５）、０．１Ｍ食塩水、０．０５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で洗浄した。遮光下、上記合成したセオオシピフルオレセイン（１）を１％含む３０％ジメチルホルムアミド－２５ｍＭリン酸トリウム緩衝液５μｌを添加し、１時間放置した後、５０％メタノール、０．１Ｍリン酸ナトリウム水溶液（ｐＨ７．５）で洗浄した。８０％グリセロールで組織切片を封入し、蛍光顕微鏡で観察してマウス腎下腺組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で３０日放置した後、同様な操作でマウス腎下腺組織に特異的なシグナルを得ることを確認した。

【００２７】実施例２

実施例１において、６－アミノフルオレセインを、５－アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式（２）で表わされる目的化合物を２００mg得た。

【化１２】



(2)

融点：１９５℃（分解）

^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（ＤＭＳＯ－ｄ６、ｐｐｍ、δ）：１．３５～１．７５（６Ｈ，ｍ）、２．４０（２Ｈ，ｔ）、２．５８（１Ｈ，ｄ）、２．８２（１Ｈ，ｄ）、３．２０（１Ｈ，ｍ）、４．１８（１Ｈ，ｍ）、４．３２（１Ｈ，ｍ）、６．３８（１Ｈ，ｓ）、６．４７（１Ｈ，ｓ）、６．５０～６．７０（６Ｈ，ｍ）、７．４２（１Ｈ，ｓ）、７．７４（１Ｈ，ｄ）、８．１０（１Ｈ，ｄ）、１０．３２（１Ｈ，ｓ）、１０．７０（１Ｈ，ｂｓ）

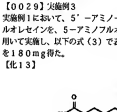
赤外吸収スペクトル（ＫＢｒ，ｃｍ$^{-1}$）：３３００、１６８９、１６３５、１６０７、１５９３、１４５５、１２９５、１２７２

【００２８】【核酸の検出】マウス腎下腺ＮＧＦの特異的抗体をウサギより調整し、これにストレプトアビジンを結合させた。マウス生後内から取り出した腎下腺をサッカロース液で固定後、マウス腎下腺のパラフィン切片を作製し、キシレンによる脱パラフィン、アルコールによる脱水などの組織切片前処理をした。次いで、１０％スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着をためにブロッキングし、ＮＧＦ抗体－ストレプトアビジンを洗浄緩衝液、上記合成した化合物（２）を１％含む、３０％ジメチルホルムアミド－２５ｍＭリン酸トリウム緩衝液５μｌで標識し、組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で３０日放置した後、同様な操作でマウス腎下腺組織に特異的なシグナルを得ることを確認した。

【００２９】実施例３

実施例１において、５’－アミノ－２，７－ジメチルフルオレセインを、５－アミノフルオレセインの代わりに用いて実施した。以下の式（３）で表わされる目的化合物を１８０mg得た。

【化１３】



(3)

融点：２２０℃（分解）

^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（ＤＭＳＯ－ｄ６、ｐｐｍ、δ）：１．３４～１．７３（６Ｈ，ｍ）、２．３５（６Ｈ，ｓ）、２．４０（２Ｈ，ｔ）、２．５８（１Ｈ，ｄ）、２．８０（１Ｈ，ｄｄ）、３．２０（１Ｈ，ｍ）、４．１８（１Ｈ，ｍ）、４．３２（１Ｈ，ｍ）、６．３８（１Ｈ，ｓ）、６．４４（１Ｈ，ｓ）、６．６０（２Ｈ，ｓ）、６．８８（２Ｈ，ｓ）、７．２０（１Ｈ，ｄ）、７．９０（１Ｈ，ｄ）、８．３２（１Ｈ，ｓ）、１０．１５（１Ｈ，ｂｓ）、１０．４０（１Ｈ，ｓ）

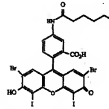
赤外吸収スペクトル（ＫＢｒ，ｃｍ$^{-1}$）：３３１２、１６９０、１６３２、１６１０、１５９０、１４５５、１２９１

【００３０】【核酸の検出】ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）の卵を回収し、Ｄ．ＴａｕｔｚらのＪｎｌ．ｇｅｎｅ．Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，Ｄ．ＴＡＵＴＺ ｅｔ ａｌ．，１９９２，６１－７３，ＩＲＬ．Ｐｒｅｓｓ）によって胚に前処理を行い、プレハイブリダイゼーションを行った。ｄｉｇ遺伝子を含むベクターよりｆｔｚ遺伝子断片のみを回収し、これをテンプレートにしてランダムプライマー法で作製したセオオシピ標識したＤＮＡプローブで、上記胚に対してホールマウント法でハイブリダイゼーションを行った。洗浄操作後、アビジンｌｍｌを添加し、０．１Ｍトリス塩酸（ｐＨ７．５）、０．１Ｍ食塩水で洗浄した。遮光下、０．１Ｍトリス塩酸（ｐＨ７．５）、０．０５％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００溶液１ｍｌに、上記合成した化合物（３）を１％含む３０％ジメチルホルムアミド－２５ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液５μｌを加えた溶液で標識し、暗所で１時間放置後９０％エタノール、７０％エタノール、５０％エタノール、０．１Ｍトリス－塩酸－０．１Ｍ食塩で洗浄した。蛍光顕微鏡で観察して組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で３０日放置した後、同様な操作でマウス腎下腺組織に特異的なシグナルを得ることを確認した。

【００３１】実施例４

実施例１において、５’－アミノ－２，７－ジクロロ－９，１２－ジイオドフルオレセインを５－アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式（４）で表わされる目的化合物を１２５mg得た。

【化１４】



(4)

融点：２２０℃（分解）

^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（ＤＭＳＯ－ｄ６、ｐｐｍ、δ）：１．３５～１．７２（６Ｈ，ｍ）、２．４０（２Ｈ，ｔ）、２．６０（１Ｈ，ｄ）、２．８５（１Ｈ，ｄｄ）、３．１２（１Ｈ，ｍ）、４．１８（１Ｈ，ｍ）、４．３０（１Ｈ，ｍ）、６．３７（１Ｈ，ｓ）、６．４６（１Ｈ，ｓ）、７．４０（１Ｈ，ｓ）、７．４５（１Ｈ，ｄ）、７．８０（１Ｈ，ｄ）、８．３５（１Ｈ，ｓ）、１０．１５（１Ｈ，ｂｓ）、１０．３５（１Ｈ，ｓ）

赤外吸収スペクトル（ＫＢｒ，ｃｍ$^{-1}$）：３３０８、１６９５、１６４０、１６０８、１５９０、１４６５、１２９５、１２７１

【００３２】【核酸の検出】マウスＮＧＦ－ｃＤＮＡをテンプレートにしてランダムプライマー法でディゴボシゲニン標識したＤＮＡプローブを調整した。マウス顎下腺組織切片を、上記ＤＮＡとハイブリダイゼーション（insitu）を行なった。ハイブリダイズした後、スチムミルクでブロッキングし、ディゴボシゲニン抗体－ストレプトアビジンをブロッキングし、ＮＧＦ抗体－ストレプトアビジンを洗浄緩衝液、上記合成した化合物（２）を１％含む、３０％ジメチルホルムアミド－２５ｍＭリン酸トリウム緩衝液５μｌで標識し、組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で３０日放置した後、同様な操作でマウス顎下腺組織に特異的なシグナルを得ることを確認した。

レプトアビジンで標識した。０．１Ｍトリス塩酸－０．１Ｍ食塩で洗浄し、上記合成した化合物（４）１％を含む、３０％ジメチルホルムアミド－２５ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液５μｌで標識し、組織に特異的なシグナル＊を得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で３０日放冗した後、同様な操作でマウス腎下脳組織に特異的なシグナルを同様に得た。

フロントページの続き

(72)発明者　竹崎　和久
東京都足立区西新井栄町１－18－１　日清紡績株式会社東京研究センター内